

OPTIMIZED CAPACITIVE SENSOR FOR CHEMICAL ANALYSIS AND MEASUREMENT

(6)

Publication number: JP2504069T**Publication date:** 1990-11-22**Inventor:****Applicant:****Classification:**

- International: G01N27/02; G01N27/22; G01N27/414; G01N33/543;
G01N27/02; G01N27/22; G01N27/403; G01N33/543;
(IPC1-7): G01N27/02; G01N27/22; G01N33/543

- European: G01N27/22B; G01N27/414

Application number: JP19880504383 19880503**Priority number(s):** US19870050367 19870518**Also published as:**

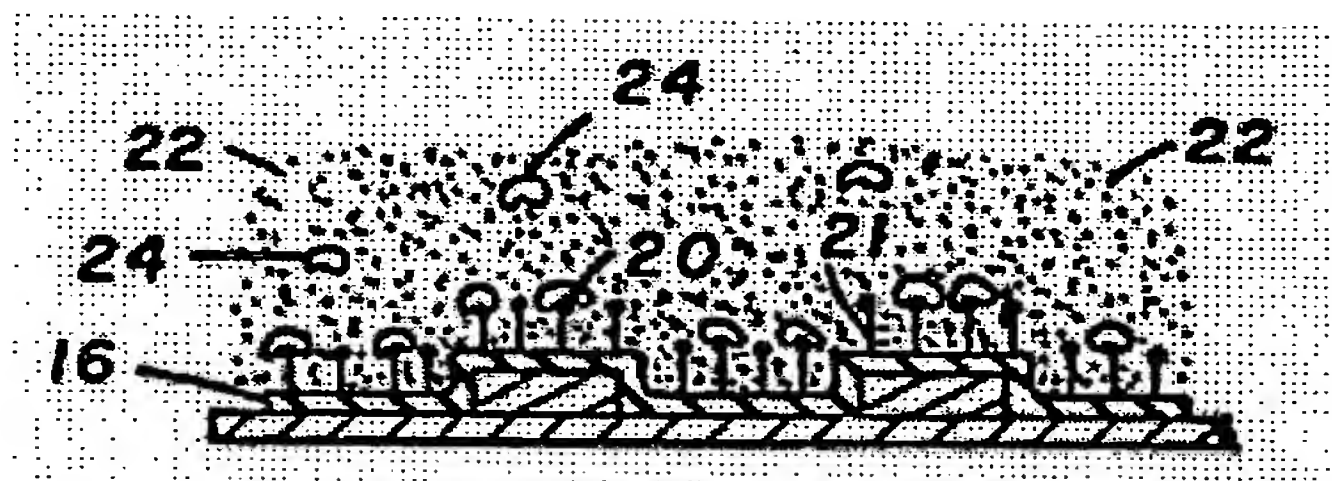
WO8809499 (A1)
EP0363401 (A1)
EP0363401 (A4)
EP0363401 (A0)

Report a data error here

Abstract not available for JP2504069T

Abstract of corresponding document: **WO8809499**

An apparatus for detecting the presence and/or measuring the concentration of an analyte (24) in the fluid medium (22) is disclosed. The apparatus relies on biospecific binding between a biochemical binding system (20) and the analyte (24) to change the dielectric properties of a capacitive affinity sensor. The biological affinity sensor is optimized by: adjusting the thickness and dielectric properties of a passivation layer (16) to generally match the impedance of the biological binding system (20, 21); and minimize the double layer capacitance so that bulk capacitance changes associated with the biological binding system (20, 21) are maximized.



Data supplied from the esp@cenet database - Worldwide

⑫ 公表特許公報(A)

平2-504069

⑬ 公表 平成2年(1990)11月22日

⑭ Int.Cl. ³	識別記号	庁内整理番号	審査請求	未請求
G 01 N 27/22	B	6843-2G	予備審査請求	有
27/02	D	6843-2G		
33/543	Z	7906-2G		

部門(区分) 6(1)

(全10頁)

⑮ 発明の名称 化学分析および測定のための最適電気容量センサ

⑯ 特 願 昭63-504383

⑰ 翻訳文提出日 平1(1989)11月17日

⑱ 出 願 昭63(1988)5月3日

⑲ 国際出願 PCT/US88/01433

⑳ 国際公開番号 WO88/09499

㉑ 国際公開日 昭63(1988)12月1日

優先権主張 ㉒ 1987年5月18日 ㉓ 米国(US) ㉔ 050,367

㉕ 発明者 ニューマン、アーノルド エ アメリカ合衆国、メリランド州、ケンジントン、ワーナー ストリート 4128

㉖ 出 願 人 ザ ジョンズ ホプキンス ユ アメリカ合衆国、メリランド州、バルチモア、サートイフオースニバーシティ アンド チャールズ ストリーツ (番地なし)

㉗ 代理人 弁理士 小林 孝次

㉘ 指定国 AT(広域特許), BE(広域特許), CH(広域特許), DE(広域特許), FR(広域特許), GB(広域特許), IT(広域特許), JP, LU(広域特許), NL(広域特許), SE(広域特許)

請求の範囲

1. 水性溶剤を持つ流体中の分析質の存在を検出するための装置であって、次のものを有する検出コンデンサからなることを特徴とする装置。すなわち、該検出コンデンサは、

第1導電体と該第1導電体から距離を置いて設けられた第2導電体とを有する基質、

該第1及び第2導電体を被覆し、1表面を境界づける電気絶縁層、

分析質とバイオ特異性に結合可能な抗原、ハプテン、バイオリセプタ、及び抗体からなる群から選ばれる結合剤、

前記表面に該結合剤を共有結合させ、かつ、分析質と表面との間の立体障害を最小にするため、前記結合剤を、該表面からある距離引き離すに相応しい連結分子、および

前記検出コンデンサと電気的に協働し、第1導電体及び第2導電体間の電気容量変化に応答する電気回路、を含む。

2. 前記連結分子が電気二重層の外側へ結合剤を伸び出させている請求の範囲1に記載の装置。

3. 前記絶縁層の組成及び厚さが、二重層直列電気容量より小さく、かつ、結合剤によって生成される直列電気容量に近い直列電気容量を発生するように選択された請求の範囲1に記載の装置。

4. 前記絶縁層の厚さ及び組成が、 1 f/cm^2 以下の直列電気容量

を発生するように選択される請求の範囲3に記載の装置。

5. 前記絶縁層が、高い誘電性のイオン不透過材料の内側薄膜及び連結分子との結合相溶性を提供すべく選択された材料の外側層からなる請求の範囲1に記載の装置。

6. 前記内側薄膜が、窒化珪素からなり、かつ、前記外側層がシリカ(SiO₂)からなる請求の範囲5に記載の装置。

7. 前記第1導電体が基質上に載置された多数の指からなり、前記第2導電体が該基質上に載置された多数の指からなり、さらに該第1導電体の指は該第2導電体の指と組み合わされている請求の範囲1に記載の装置。

8. 流体中の分析質の存在を検出するための装置であって、検出コンデンサ及び回路手段からなることを特徴とし、該検出コンデンサは、

第1導電体及び該第1導電体から距離を置いて設けられた第2導電体を持つ基質、

該第1導電体及び第2導電体を被覆し、一表面を境界づける電気絶縁層、

バイオ特異性結合サイトを持つ第1有機化合物、

該表面に該第1有機化合物を共有結合し、かつ、分析質と表面との間の立体障害を最小にするため、該第1有機化合物を、該表面からある距離引き離す、該第1有機化合物に適合した連結分子、

抗体、レクチン、酵素、及び神経系受容体(ニューラル・リセプタ)からなる群から選ばれる有機化合物から本質的になり、

そして、該第1有機化合物に可逆的に結合される結合剤であって、該結合剤は該第1有機化合物及び該分析質の両方とバイオ特異性に反応性であり、その結果、液体含有分析質に該結合剤を曝すことが複合結合を通して結合剤・分析質複合体の生成を引き起こし、該結合剤・分析質複合体が該表面から拡散する程自由である結合剤、

前記検出コンデンサと電気的に協働し、前記第1導電体及び第2導電体間の電気容量変化に応答する回路手段、
を有する装置。

9. 前記連結分子が電気二重層の外側に第1有機化合物を伸び出させる請求の範囲8に記載の装置。

10. 前記絶縁層の組成及び厚さが二重層直列電気容量より小さく、連結分子で表面に結合された第1有機化合物によって引き起こされる直列電気容量に近づく直列電気容量を発生するために選択された請求の範囲8に記載の装置。

11. 前記絶縁層の厚さ及び組成が、 1 f/cm^2 以下の直列電気容量を発生するように選択された請求の範囲10に記載の装置。

12. 前記絶縁層が内側は高い誘電性のイオン不透過性材料の薄膜、外側は連結分子との結合相溶性を提供するべく選択された材料の層からなる請求の範囲8に記載の装置。

13. 前記内側薄膜が強化珪素からなり、前記外側層がシリカ(SiO_2)からなる請求の範囲12に記載の装置。

14. 前記第1導電体が前記基質上に載置された多数の指からなり、前記第2導電体が該基質上に載置された多数の指からなり、

該第1導電体の指が該第2導電体の指と組合わされている請求の範囲8に記載の装置。

15. 更に前記第1導電体と第2導電体とを取囲む膜であって、該膜は分析質は通すが、前記結合剤を通さないように選択された孔径を持ち、その結果該結合剤が該膜によって囲まれた第1導電体及び第2導電体に接する容積内に保持される請求の範囲8に記載の装置。

16. 更に第2導電体から離れて設けられた第1の導電体を持つ基質、そのような第1及び第2導電体を被覆し、関連表面を確定する電気絶縁体からなる比較コンデンサ、及び
該比較コンデンサに電気的に組み合わされ、該第1導電体と第2導電体との間の電気容量変化に応答する関連回路からなる請求の範囲8に記載の装置。

明 細 書

化学分析および測定のための最適電気容量センサ

関連出願の交互引用

これは1985年11月19日提出の特許出願第199,761号の一部継続出願である。

発明の背景

発明の分野

本発明は、流体媒質中の分析質の濃度測定装置に関し、更に詳しくは、生化学結合系と分析質とのバイオ特異性結合に起因する誘電特性の変化を検出するために独特に設計された電気容量センサに関するものである。生化学結合系は、テストされる特定の分析質又は分析質群に対して特異性親和力を持つように選択される。

先行技術の記載

分析質に対し特異性親和力を持つ結合物質を用いて流体媒質中の分析質の濃度を測定するための種々の先行技術が提案されている。イムノアッセイ(免疫学的定量法)は、流体媒質中のハプテン(免疫原性を持たない低分子抗原)、抗原及び抗体のごとき分析質を同定するために用いられる。これらのイムノアッセイは、抗原及び抗体間のバイオ特異性結合のような、反応対成分間のバイオ特異性結合に基づいている。結合対の成分の一つにタグを付けることは、より精密な定量を可能にする。例えば、ラジオ・イムノアッセイはバイオ特異性結合対成分の一つに対するラベルとしてラジオ・アイソトープを用いる。同様

に、蛍光ラベルが蛍光イムノアッセイで用いられている。

最近、分析質濃度を直接測定できる電気化学的センサを開発する企てがなされた。このようなセンサは、イムノアッセイの実験的換作を著しく単純化し、迅速化し、かつ、その実験精度を高めるであろう。これらのセンサは、一般に、その結合対の一つ(一般に抗原)が、その結合対の他方(一般に抗体)にバイオ特異的に結合するときにかかる物理的、電気的、又は光学的性質の変化を検出する。トーマス ケイ ライス[Thomas K. Rice]に付与された米国特許第4,314,821号では、抗体がピエゾ電気発振器に結合する時の該発振器の共振周波数の変化を検出している。共振周波数の変化は、発振器表面上に結合される複合体の蓄積量に比例する(即ち、抗体・抗原複合体の蓄積量の増加は発振器の共振を物理的に変化させる)。ジョンエフ シェンク[John P. Schenck]に付与された米国特許第4,238,757号では、流体媒質中の抗原を蛋白質表面層と接触させ、抗原・

抗体バイオ特異性結合反応を通して該蛋白質表面層の電荷を変化させている。F効果(フィールド エフェクト)トランジスタが、この電荷の変化を検出するために用いられている。同様に、米国特許第4,444,892号及び第4,334,880号では、特定のバイオ特異性結合反応で起る電荷の変化をポリアセチレン半導体装置を用いて検出している。ルチャード シイエバーソール[Richard C. Ebersole]に付与された米国特許第4,219,325号は、リアクタンس・タグでラベルされた免疫性試薬の使用を教えている。これらのタグは、テスト表面の誘電特性、導電特性

又は電気特性を変化させるので、電氣的に検出できる。該特許はテスト表面へのレセプタ(受容体)剤の結合を開示している。ある抗体を含む患者の体流体(体液)はテスト領域に加えられ、該抗体は該レセプタ剤と複合体を作る。第2段階で、テスト領域は、リアクタンス タッグに結合される第2の免疫性試薬に曝される。この免疫性タッグは、もしテスト表面上にレセプタ剤・患者抗体複合体が存在しているなら、該複合体と複合化する。金属又は金属酸化物を含むリアクタンス タッグは電氣的手段によって検出される。

アイバー ギャバー[Ivar Giaever]に付与された米国特許第4,054,846号は抗原・抗体反応が単分子層を生成するか、又は2分子層を生成するかどうかを電氣的手段によって測定する方法を開示する。抗原は金属基質を被覆する為に用いられている。被覆された基質は、次いで、ある種の抗体が含まれている疑いのある流体と接触させられる。もし抗体が存在しているなら、その抗体は抗原層に付着して2分子層を形成する。もし抗体が存在していないなら、単分子層のままに留まる。次の段階は、上層に水銀滴を置き、水銀滴と金属基質間の電氣容量を測定することである。水銀滴と金属基質間の距離は、2分子層になると単分子層に比べて変化してくるから、測定される電氣容量も又変化してくる。ハンス アーウィン[Hans Arwin]等に付与された米国特許第4,072,516号は、流体媒質中に浸漬された二つの白金電極間の交流電圧インピーダンスを測定することを開示する。生化学物質は金属表面上に吸着される。もしテスト中の

遊離分子で不動化される。結合剤分子は、抗体又は抗原であり得る。結合剤分子はビールス、バクテリア、抗体、又は大分子のごとき特定の分析質に対しバイオ特異性を持っている。分析質を含む流体がセンサ上に導入されると、分析質は不動化された結合剤に結合する。分析質が不動化された結合剤に結合すると、"開放型"コンデンサの誘電特性に変化が起る。第2の具体例は競合結合具体例と呼ばれるものであるが、より精巧な生化学結合系を用いるものである。この方法は、分析質分子が比較的小さいときに好まれる。生化学結合系は、遊離分子で表面に不動化された分析質又は分析質類似物質の第1層を持つ。結合剤の第2層は、分析質に対しバイオ特異性であり、不動化された分析質層上において結合される。結合剤分子はより大きな分子であって流体媒質より低い誘電定数を持っている。流体媒質中の遊離分析質分子がセンサ上に導入されると、該遊離分析質分子は結合剤分子と結合しようとして不動化された分析質分子と競争する。この競合的結合は、結合剤分子の一定量につき遊離分析質分子との複合体を作ることを結果する。遊離分析質・結合剤複合体は、次いで、表面から拡散して測定される電氣容量を変える。

c. 本発明は又、微分親和性センサを作るために、本発明の分析質親和性コンデンサと少なくとも一つの比較コンデンサを結合することを教える。この比較コンデンサは、非分析質効果を補正するために用いられる。これらの非分析質効果は、流体媒質内に含まれる他の蛋白質の非特異性結合の他に、流体媒質

流体が、該吸着物質にバイオ特異的な分析質を含むならば、結合が起るであろう。例えば抗原は金属電極上に直接吸着され、テスト流体中の特異性抗体は抗原と結合し、金属電極の表面上に留まる複合体を形成することができる。電氣容量は、その表面が抗原の単分子層で被覆されるか、又は、抗原及び抗体層で構成される2分子層が表面上に吸着されるかどうかによって変化するようになる。

発明の要約

本発明は、流体媒質中の分析質の濃度を測定するための電氣化学的センサの新規な型を提供するものである。本発明は、従来法に比較し測定速度と測定精度を増加するものである。

引用により本発明に取り込まれる、1985年11月19日出願の「化学分析および測定のための電氣容量センサ」なる名称の米国特許第199,761号は、本発明の次の特徴を記述している。

a. 本発明は生物学結合層に接する容量測定領域中に一つのより高い電場を生成する"開放型"コンデンサを用いる。この"開放型"コンデンサの電極は、絶縁不動態化層で被覆されている。該生物学結合層は、連結分子により、該絶縁不動態化層上に不動化(固定)される。バイオ特異性結合反応が、結合層から生化学分子を引き込み又は解き放すために利用される。これら生化学分子の動きは、異なった誘電定数を持つ流体媒質の分子を置き換え、こうしてセンサの電氣容量に変化を引き起こす。

b. センサには大略二種の具体例がある。第一の具体例は、直接結合態と呼ばれるもので、結合剤分子は、不動態化表面に、

の温度、イオン濃度、pH、組成、及び物理状態の変化によって引き起こされる流体媒質の誘電定数の変化を含む。

d. 本発明の電氣容量センサは、体液中の特異性分析質の濃度を測定するために用いることができ、体内及び体外での測定用センサとして機能し得る。本コンデンサ センサは又、自然環境における特異性物質検出用に用いられ得る。比較コンデンサの使用は、分析質を含んでいる流体媒質の物理的、化学的特徴が変化する場合でさえも、センサが関連的に分析質濃度を測定することを可能にする。電氣容量親和性センサは、バクテリア、ビールス、抗体、大蛋白質分子、抗原、ハプテン、多糖類、グリコプロテイン(糖蛋白質)、グリコリピド(糖脂質)、酵素阻害剤、酵素基質、神経伝達物質及びホルモンを含む広範な分析質を検出することに用いることができる。

本明細書は、本発明の電氣容量親和性センサの最適化を、次の二つの観点(1)、(2)から吟味する。(1)絶縁不動態化層の厚さと誘電特性を調節して、不動態化層の電氣容量を生物学結合層電氣容量に接近させること、(2)電解質がテスト下の流体中に存在しているとき通常発生する好ましくない二重層現象を最小限に抑え、生物学結合層と関連する所望の全誘電変化を最大にすること。

図面の簡単な説明

第1a図及び第1b図は、直接結合構造の断面略図であり、第1a図は電氣容量センサの構造を示し、第1b図は、流体媒質中の分析質の存在を検出する為の電氣容量センサの操作を説

明するものである。

第2 a 図及び第2 b 図は、銑合結合構造の断面略図であり、第2 a 図は電気容量センサの構造を示し、第2 b 図は、流体媒質中の分析質の存在を検出する為の容量センサの操作を説明するものである。

第3 図は、多数の組み合わせられた指を用いる“開放型”コンデンサの斜視図である。

第4 図は、連結分子によって不動態化層に結合された抗原結合剤の図である。

第5 a, b 及び c 図は、比較コンデンサの種々の具体例を示す断面図であり、第5 a 図は生化学結合系を含まない比較コンデンサを示し、第5 b 図は結合系に対する“ダミー”結合剤を用いる比較コンデンサを示し、第5 c 図は“ダミー”分析質・結合剤対からなる結合系を用いる比較コンデンサを示す。

第6 図は、電気容量センサで用いられる操作回路の略図である。

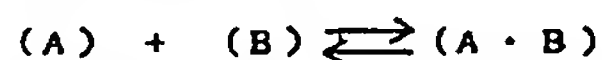
好ましい具体例の詳細な説明

電気容量化学センサは、多くのバイオ特異性化学結合法のどれかによって、分析質に対して化学的に敏感にさせることができる。これらのバイオ特異性結合法は次の二つの一般範ちゅうに落ち着く。(1)銑合結合構造、(2)直接結合構造である。ここで“分析質”なる語[analyte]は、分析されるスピーシス(種)を意味する。

直接結合具体例

唾液、精液のような体液であり得るし、又、それは分析質を含む他の緩衝溶液であり得る。流体分子22は一般に水分子及び少量の蛋白質分子、電解質等を含むであろう。

操作において、流体媒質内の分析質種が“開放型”コンデンサセンサに入り、その表面に接近するとき、不動化された結合剤(即ち、配位子層)に結合する。連結分子21及び結合剤20の構造は、一つの誘電機能、即ち、生物学結合層上に分析質を誘導する。連結分子は、結合反応中(一般に共有結合が用いられる)に不動態化表面16から離れ落ちないように、結合剤を十分に強力な化学結合で結合しなければならない。この結合は、結合剤、分析質及び結合剤・分析質複合体(即ち、配位子・分析質結合種)間の平衡が達成されるまで起こるであろう。この平衡関係は、次の式で表される。



ここに、A = 分析質、B = 結合剤、及び(A · B)は結合複合体である。

分析質種が生物学結合層に結合すると、流体分子は置き換えられ、その結果得られる、生物学結合層と関係する誘電定数が減少する。この誘電定数の変化は分析質濃度に比例するだろう。その変化は次の式によって関係付けられる。

$$(1) \quad [A \cdot B] / [A][B] = K$$

$$(2) \quad TA = [A] + [A \cdot B]$$

$$(3) \quad TB = [B] + [A \cdot B]$$

ここで、[A] = 遊離分析質濃度

第1 a 図は、直接結合構造として挙げられるセンサの第1の一般的構造を示す断面略図であるが、第1導電体10が絶縁材料または基質12の表面上に置かれ、第2の導電体14が基質12上に、第1の導電体10と一定距離をおいて配置される。二つの導電体10、14は、薄い電気絶縁不動態化層16で被覆される。かくして得られる構造が“開放型”コンデンサを形成する。直流電圧又は交流電圧が導電体に加えられると、フラックス(束)18の電気線を持つ電場が発生する。第1 a 図に一般に見られるように、電場は“開放型”の面コンデンサに接した容量測定域内に、一つの高より高いフィールド インテンシティ(場強度)を持つ。

結合剤20の分子は連結分子21で不動態化層16に不動化(固定)される。第1 a 図において、不動化された結合剤の層は、不動態化表面16の全面を被覆する。結合剤は特定のビールスに特異的に結合する抗体、又は特定の抗体に特異的に結合する抗原のような、分析質に特異的に結合するアフィニティ・リーガント(親和性配位子)である。あるいは又、親和性配位子は、例えばヌクレオチド類似物質及びレクチンが生化学分析質の特定の群に結合するように、分析質の特異的群に結合し得る。

第1 b 図において、特定の分析質のテストをするための流体媒質が“開放型”コンデンサ上に導入される。センサは体内医療用センサ又は環境センサの場合におけるがごとく、流体内に浸漬され得るし、又は流体媒質の少容量がセンサ上に注入されることもできる。流体媒質は、第1 b 図に示すごとく、流体分子22及分析質分子24で構成される。流体媒質は、血液、尿、涙、

[B] = 結合剤(配位子)濃度

[A · B] = 結合した分析質・配位子複合体

TA = 全分析質濃度

TB = 全結合剤(配位子)濃度

上記平衡式は近似式にすぎず、センサの一般的機能を説明するためにのみ用いられるにすぎないと理解すべきである。量TB、即ち不動化された結合剤分子の数は、既知である。量Kは既知であるか又は実験により測定可能である。濃度[A · B]は“開放型”コンデンサの誘電定数の変化によって測定される。テスト流体中の全分析質濃度(TA)は測定すべき値である。

必ずとは言わないが、通常は、直接結合構造に対する分析質種は、バクテリア、ビールス、抗体、又は蛋白質分子のような大分子(一般に150,000ダルトンより大きい)であろう。分析質分子が大きければ大きい程、そしてその誘電特性が低ければ低い程、分析質が生物学結合層に結合するときのセンサの電気容量の変化は一層大きくなるだろう。分析質が結合剤に結合するとき、電場内におけるその局動度は減少し、それにつれて誘電定数は低下する。結合した分析質の誘電定数が、生物学結合層の近辺から排除された流体(一般に水)よりも低い時、センサの電気容量は修正される。表1は、センサの直接結合構造で用いられ得る型の結合剤(配位子)及び分析質の非限定的実施例を含むものである。

表 1

不働化された結合剤	分析質
バイオ特異性抗体	バクテリア
バイオ特異性抗体	ビールス
バイオ特異性抗体	第 2 抗体
バイオ特異性抗体	大分子分析質、例えば蛋白質分子
バイオ特異性抗原	抗体
バイオ特異性ハプテン	抗体
バイオレセプタ(受容体)	ホルモン、神経伝達物質、 トキシン

競合結合具体例

本発明の第 2 の一般的具体例は第 2 a 図の断面略図に示される。この具体例はセンサの競合的結合構造として挙げられ、小分子である分析質の検出に有用である。この場合に、小とは、150,000ダルトン(1ダルトン=1原子量単位)よりも分子量のかなり小さいものとして定義される。第 1 導電体 26 が絶縁材料又は基質 27 の表面上に置かれ、第 2 導電体 28 は基質 27 上の第 1 導電体 26 から離れた場所に置かれる。二つの導電体 26、28 は、薄い電気絶縁不動態化層 30 で被覆され、得られる構造は、第 1 直接結合具体例で用いられたと同様に、“開放型”コンデンサを形成する。第 1 具体例におけるごとく、直流又は交流の電圧が導電体を横切って加えられる時、電束 32 の電気線を持つ電場が発生する。

学結合層に入るのを許す。この結果は、コンデンサの誘電定数の増加をもたらす。誘電定数の変化は、次式によって示されるように、分析質種の濃度に比例するだろう。

- (4) $[A \cdot C] / [A][C] = K1$
- (5) $[A \cdot B] / [A][B] = K2$
- (6) $TA = [A] + [A \cdot C] + [A \cdot B]$
- (7) $TB = [B] + [A \cdot B]$
- (8) $TC = [C] + [A \cdot C]$

ここで、[A] = 結合剤濃度

[B] = 遊離分析質濃度

[C] = 不動化分析質濃度

[A · B] = 遊離分析質・結合剤複合体

[A · C] = 不動化分析質・結合剤複合体

TA = 全結合剤濃度

TB = 全遊離分析質濃度

TC = 全不動化分析質濃度

上記平衡式は近似式にすぎず、センサの一般的機能を説明するため用いられるにすぎないものと理解すべきである。これらの式において、量 TA、即ち結合剤分子の数は、既知である。量 K1 及び K2 は既知であるか又は実験により測定可能である。濃度 [A · C] は“開放型”コンデンサの誘電定数の変化によって測定される。量 TC、即ち不動化分析質分子の数は既知である。テスト流体 (TA) 中の分析質の全濃度は測定すべき濃度である。

直接結合具体例と競合結合具体例の間の本質的差異は 2 層生化学結合系が後者において用いられる点にある。第 1 層 34 は、遷移分子 35 によって不動態化表面 30 に不動化される分析質又は分析質類似物質の分子から作られる。第 2 層 36 は、分析質とバイオ特異性となっている結合剤分子から作られる。第 2 層 36 は、不動化分析質層 34 に結合する。結合剤分子は一般に分析質分子に比較して大きい。

第 2 図において、特定分析質に対してテストされるべき流体媒質は、直接結合具体例でなされたごとく、“開放型”コンデンサ上に導入される。体流体(体液)又は流体緩衝剤であり得る流体媒質は、液体分子 38 及び分析質分子 40 からなる。流体分子 38 は、一般に少量の蛋白質分子、イオン物質等と共に水分子を含む。結合剤は、主成分をなす流体分子、一般には水分子の誘電定数より低い誘電定数を持つように選択され、結合剤分子は主成分流体分子より実質的に大きくなるように選択される。

操作において、流体媒質内の分析質種が“開放型”コンデンサセンサに入れられ、2 層生化学結合系に接近する時、該分析質種は不動化分析質 34 と競合して結合剤分子 36 と競合する。結合剤分子は動的平衡にあるから、常に不動化分析質に結合されない分子の小部分が存在する。遊離の分析質が系に入る時、これらの結合していない結合剤分子のある物は遊離の分析質に結合する。これは、平衡が戻った時、生化学結合系の表面からの結合剤分子の全面的な損失をもたらす。結合剤・遊離分析質複合体は、結合剤系から拡散し、より高い誘電率の流体分子が生物

生化学結合系の第 2 層を形成する結合剤は、一般的又は特異的親和性配位子から選択され得る。そして、抗体、レクチン、酵素及び受容体(これらに限定されない)を含む。生化学結合系の第 1 層を形成する不動化分析質は、テスト下の分析質と同じ分子物質で有り得るし、また結合剤にバイオ特異的な分析質類似物質であり得る。不動化分析質は、例えば抗原、ハプテン、多糖類、糖蛋白、糖脂質、酵素阻害剤、酵素基質、神経伝達剤、ホルモン等であり得る。表 2 は、特定分析質に対するテストのための競合結合具体例に用いられる生化学結合系の非制限的実施例を含む。

表 2

生化学結合系		分析質	センサの クラス
不動化された分析質結合剤			
抗原	抗体	抗原	A
ハプテン	抗体	ハプテン	A
多糖類	レクチン	多糖類	B
糖蛋白質	レクチン	糖蛋白質	B
糖脂質	レクチン	糖脂質	B
酵素阻害剤	酵素	酵素阻害剤	C
酵素基質	酵素	酵素基質	C
酵素阻害剤	酵素	酵素基質	C
神経伝達剤	神経受容体	神経伝達剤	D
ホルモン	神経受容体	ホルモン	D

特表平2-504069(6)

表IIから分かるように、組合結合センサに4クラスがある。クラスAでは、結合剤は分析質に特異性の抗体である。分析質は抗原又はハプテンであり得る。生化学結合系は、第1層における不動化分析質に生化学的に結合されたバイオ特異性抗体の第2層を持つ抗原又はハプテン分析質の第1不動化層を含む。

クラスBでは、結合剤はレクチンである。レクチンは、分析質群に特異性を示す一般の配位子である。レクチン・ベースのセンサは、生化学結合系との反応から一般分析質群中の大分子を排除する適切な分子認識によって一層特異的にされ得る。このクラスでは、例えば、結合系は多糖類又は特定の構造の炭水化物を含む蛋白質の第1不動化層、及び第1層に結合された一般のレクチンの第2層を持つことができるだろう。

クラスCでは、結合剤は酵素阻害剤又は酵素基質と反応する酵素である。このクラスでは、例えば、結合系はセンサ表面上に不動化された特定酵素に対する阻害剤及び第1層内の阻害剤に結合した酵素を含む第2層を持つことができるであろう。テスト流体中の特定酵素基質と共に、酵素結合剤は結合系の表面から引き付けられるだろう。

クラスDでは、結合剤は神経受容体である。神経受容体は、その機能を、種々の神経毒及び他の剤によって著しく変化させられる。結合系は第1層に結合されたアセチルコリン受容体分子の第2層で、センサ表面上に不動化された塩化サクシニルの層を持つことができる。もし神経毒が、例えば、テスト流体

中に存在するならば、受容体結合作用は変わるだろう、そして、それは結合系表面から外されるだろう。その結果センサの誘電特性は変わってしまう。これらは、勿論本発明の組合結合具体例で用いられ得る生化学結合系の単なる実施例にすぎないと理解されるべきである。

開放型コンデンサ構造

第3図は、多数の組み合わされた指を用いる開放型コンデンサの斜視図である。金属導電体42及び44は、絶縁基質46上に置かれる。各導電体は、他の導電体の指との関係で組み合わされた態様で配置される沢山の指を持つ。公知のフォトリソグラフィ・エッチングの技術が、基質上の組み合わされた指を形成するために用いられる。基質は、コーニング7059ガラス又はアルミナ・ウエハーのような絶縁材料から作られ得る。組み合わされた指は、導体又は半導体材料共に使用可能であるが、銅及び金で作られ得る。出願人は、約0.5ミルの高さで3ミルの間隔の巾2ミルの指を選択した。勿論他の寸法のものも用い得る。(実際、電極の指は構造体上に堆積されるよりむしろ基質内に包埋される。)組み合わされた指は、絶縁不動態化層48で被覆される。出願人は、公知の堆積方法を用いて堆積させたパリレン[parlylene]ポリマーの1~2.5ミクロンの被覆と真空蒸着を用いて堆積させた0.3ミクロンのSiO₂層で絶縁層48を作った。しかしながら、交流電気絶縁不動態化材料を用いることもできる。

不動態化層の最適化

電気容量線形性センサの設計における重要要素は、不動態化層の材料及び厚さ(要素48、第3図)の選択である。不動態化層は二つの機能に貢献する。第1の機能は、電解反応がベースラインに意味のある流れになりそうな電極表面上の変化(即ち、腐食)を引き起こすかも知れない場合、金属電極表面への水又はイオンの移動を防止しなければならないことである。第2の機能は、不動態化層が連結分子によってハプテン又は他の結合分子のセンサ表面への化学的連結をすることができるようにする反応表面を提供することである。

しかしながら、不動態化層は他の機能にも貢献できる。このことを理解するためには、異なる層の電気容量が互いに影響し合う仕方を観察する必要がある。不動態化層及び生物学層の電気容量は直列の二つのコンデンサと見なすことができる。直列電気容量は次の関係式を用いて結合される。

$$C = 1 / (1 / c_1 + 1 / c_2)$$

この式から理解されることは、2層の測定可能電気容量全体の測定においては、小さな電気容量は、大きな電気容量より大きな効果を持つということである。電気容量線形性センサにおいて、望ましい電気容量変動は、生物学結合層内に起こる。それ故、電気容量全体における最大変化を見るためには、不動態化層電気容量を、生物学結合層電気容量に出来るだけ近づけることが重要である。両電気容量の適合を助けるために操作できる二つのパラメータがある。不動態化層の厚さとその誘電定数これがこれである。不動態化層の電気容量を上げるためには、不動

態化機能を保持したまま、厚さは出来るだけ薄くするべきである。材料の選択が誘電定数を決定するだろう。しかしながら、材料の選定は、不動態化機能と表面に対する生物学結合の容易さの両方をバランスさせるものでなければならない。後者の問題に対する一つの解決は、第4図に示されるような2層の不動態化層を使用することである。底層50は電極52上に堆積され、水とイオンに対する真の保護を提供し、第2の外側薄層54は結合能力を提供する。この実施例は、不動態化材料として窒化珪素(シリコンナイトライド)を使用した例である。窒化珪素は水及びイオンに対して非常に良い抵抗を持ち、3000Å又はそれ以下の厚さのフィルムとして用いることを可能にする。加えて、その比較的高い誘電定数(6~8)は不動態化層の電気容量を更に上げることに役立つ。シラン連結分子との反応性がより高いシリカのような弱い不動態化材料の層を、これに付着させることができる。

要約すると、不動態化層は次の仕方で最適化される。

A. 非常に緻密な、水及びイオンを通さない薄いフィルム材料、例えば窒化珪素が選ばれる。もっとも殆ど同じように効果的な他の材料も有るだろう。

B. フィルムの厚さは生物学層の厚さの程度内に保たれる。厚さは、ピンホールのない薄いフィルムを生産する能力によって技術的に限定される。フィルムは薄ければ薄い程、ピンホールを持つ確立は高くなる。500~3000Åのフィルムの厚さが目安である。

C. フィルムの誘電定数は出来るだけ大きく、生物学的結合層の誘電定数と厳密に適合すべきである。

D. 不動態化層は、連結分子に対して良い結合サイトを提供すべきである。シラン連結分子が用いられるときには、不動態化層を被覆する薄いシリカ (SiO_2) 層が望ましい。

連結分子構造の最適化

直接系又は融合系の両系に対する生物学結合層は、連結分子によって不動態化層に結合される。連結分子は次の機能を要す。

A. 生物学結合層 (例えば、直接構造における抗原) は、分析質と表面間の立体障害無しに免疫学的に存在し得るよう十分に離して表面から持ち上げられていなければならない。

B. 生物学的結合層は、安定な結合が確保されるよう、即ち、それが表面から逃げないように、化学的に結合されなければならない。単に表面上に吸着されるだけなら、ある程度の脱着が起こるだろう。連結分子は、系に普遍性を与える。なぜなら、どの分子も表面に化学的に結合され、単なる非特異的吸着特性 (ある分子は特定の表面に強力に吸着し、ある分子は殆ど全く吸着しないような) に頼らなければならないのではないからである。

C. 抗原又は他の不動化された薬剤が、センサの適切な機能に対して必要であるかも知れない結合プロセスのどれかに対する干渉を避けるために、表面から十分に遠く保持することを確保するのに十分なだけ、連結分子は長くなければならない。連結分子の長さは、望ましくない二重層電気容量の通常の大きさを

である。かくして電気容量親和性センサの活性部分は、実質的に二重層の外側にある。

電気的二重層効果の最小限化

もしテスト溶液に電解質が存在するならば、不動態化層及び生物学結合層の電気容量の他にさらに付加的な電気容量が存在する。この付加的電気容量は“電気的二重層”の電気容量に基づくものである。しかしながら電気容量親和性センサにおいては、上述したように、この二重層電気容量の値が大きいため、この電気容量は不動態化層及び生物学層の電気容量に関しては無意義である。指摘したように、直列に結合した電気容量においては、最小電気容量のコンデンサが支配的影響力を持つ。文献 (デイ・シー・グラハム “ケミカル・リビューズ”) [D. C. Graham “Chemical Reviews”] 第41巻、第441頁、1947年のデータは、二重層電気容量は 1 cm^2 当りのマイクロファラッド ($\mu\text{F}/\text{cm}^2$) で 10 s のオーダーであり、これと比べ、生物学層は $1 \text{ f}/\text{cm}^2$ 以下、不動態化層 (2000 \AA 窒化珪素) は $0.03 \text{ f}/\text{cm}^2$ 以下であることを示している。その結果、二重層電気容量、即ち不動態化層上への分子の直接吸着による電気容量の何らかの変化も、系によって検出されないであろう。不動態化層から提供される電気容量は、二重層電気容量の効果を除去するための主要因子である。連結分子の長さ (第4図に示されるように) は又、生物学結合層を二重層効果の外側へ出し伸ばすものである。これらの因子は、二重層電気容量の効果を減殺し、生物学的結合層内の全誘電特性変化を、“開放型”面電気容量で検出で

越えた化学作用を維持するものであることに注意されたい。

D. 連結分子はセンサの生物学成分を物理的、化学的に安定化するのに役立ち、その経時的崩壊を防止するのに役立つ。

電気容量親和性センサは、一つのポテンシャルが加えられるとき電極の周囲に形成される二重層の崩壊を通してではなく、全溶液電気容量の変化を通して機能する。これを説明するために、我々は実施例としてペンタクロロフェノールに対して抗体を結合することができるセンサを提供する (第4図を見よ)。センサは、 2000 \AA 厚みの窒化珪素の被覆50及びシリカの薄層54で不動態化した。不動態化層は次いで3-アミノプロピルトリエトキシシランで被覆される。アミノ基は次いでブタン酸 (脂肪酸) 連結分子56を通じて、ペンタクロロフェノール類似体、2,6-ジクロロフェノールに連結される。溶剤系は磷酸塩で緩衝された生理的食塩水 (0.01 M 磷酸塩、 0.9% NaCl 、 $\text{pH } 7.4$) である。

この二重層内の変化への反応からセンサを守る主要因子は、抗体だけでなく、ハブテン被覆、即ち、2,6-ジクロロフェノール基58の活性元素が二重層の外側にあるということである。

センサ内の電気容量変化の原因となる抗体は、ジクロロフェノール基58に結合する。表面に付着される分子の幾何学の分子力学的計算は、シランに付着される連結酸素原子とベンゼン環の最密炭素との間の距離が 11.1 \AA であることを示す。フェノール酸素までの距離は 14.6 \AA である。抗体はその上に 100 \AA 伸びる。二重層の大きさは 7.9 \AA まで伸びているだけ

きるようにする。しかし二重層電気容量には信頼性がないから、本発明は二重層電気容量に依存しない。二重層電気容量の測定は、とりわけ非常にクリーンな導電体電極の使用を要求する。ホッリのような物質の非特異性吸着、又はこれら導電体の酸化は、二重層の測定電気容量に変動を引き起こす。この理由により本発明は、二重層の測定の代わりに生物学結合層の全電気容量の測定に依存している。前に検討したように、この生物学層における全誘電特性の巨大変化は、生物学結合層に結合している生物学分子による高次の誘電流体分子 (一義的には水) の変位に基づくものである。

微分電気容量センサ

本発明の直接結合及び融合結合両具体例の正確度は、もし微分センサが使用されるなら増加する。微分電気容量センサは、分析質親和性センサ (即ち上で検討した直接結合電気容量センサ又は融合結合電気容量センサ) 及び非分析質効果を補償するための少なくとも一つの比較コンデンサを用いる。この比較コンデンサは、流体媒質中に存在するかもしれない蛋白質の非特異性結合の他に、流体媒質の温度、イオン濃度、 pH 、組成、及び物理的及び化学的状態の変化によって引き起こされる流体媒質の誘電定数の変化を補正する。第5a、b、及びc図は、比較コンデンサの種々の具体例を示す。各比較コンデンサは、上記の“開放型”コンデンサを形成するために基質上に置かれた第1及び第2導電体60、62を持っている。第5a図には、直接及び融合結合の両具体例で用いられ得る比較コンデンサが示さ

れている。この比較コンデンサは蛋白質被覆を持たない。即ち、それは不動化結合剤又は結合系を持たない。第5b図には、直接結合具体例に用いるための比較コンデンサが示されている。この比較コンデンサは“ダミイ”結合剤64の不動化層を含む。“ダミイ”結合剤は、分析質感受性結合剤と同じクラスから選択されるが、テスト環境で見い出せない分子に対してバイオ特異性を持たされたものである。又は、もし比較コンデンサが親和性コンデンサと同じ結合剤を用いるならば、分析質が比較コンデンサに入るのを防ぐために、分子篩が用いてもよい。第5c図には、競合結合具体例で使用するための比較コンデンサが示されている。この比較コンデンサは、“ダミイ”生化学結合系を含む。“ダミイ”結合系としては“ダミイ”結合剤68と特異的に反応する不動化された“ダミイ”分析質66を用いる。“ダミイ”分析質及び結合剤は、真の分析質及び真の結合剤に密接に適合する親和性定数その他の物理的特徴を持つように選択される。もし抗原・抗体対が、親和性コンデンサの結合系に対して選択されるならば、“ダミイ”抗体は、分析質抗原とはバイオ特異性がないが同じクラスの抗体及び同じ型の動物から選択されるだろう。比較コンデンサは、不動化された“ダミイ”分析質層のみを用いることができ、“ダミイ”結合層を用いることはできない。換言すれば、比較コンデンサは親和性コンデンサと同じ抗原・抗体対を用いることができるが、分析質が比較コンデンサに入ることを防止するための分子篩が用いられるだろう。上にアウトラインを示した異なるタイプの比較コンデンサの各々は、流体媒質中

層を形成する。センサは分析質を通すには十分大きいが、センサに接触又は近接した抗体は通さないよう十分小さな孔径を持つ分子篩膜によって包囲される。この実施例は、分子量が約150,000ダルトンの抗体に比較して小さいか中位の分子量を持つ分析質に通している。この実施例で、絶対とまでは言えないが、最適な比較コンデンサは、“ダミイ”分析質及びそれと共に用いられる特異性“ダミイ”抗体が用いられる以外、分析質感受例と厳密に同じ方法で作られる。“ダミイ”分析質及びその特異性抗体は、分析質及び分析質特異性抗体の特徴に厳密に適合する親和定数及び他の物理的特徴を持つように選択される。比較コンデンサもまた分子篩によって包囲される。結合“ダミイ”抗体を持たない第2の比較コンデンサ構造も用いられる。

実施例2 直接結合具体例

バクテリアのような特定細胞又はビールス又は大分子に対し特異性のある抗体が、“開放型”コンデンサの表面上に、連結分子により不動化され、結合剤分子を形成する。大分子、バクテリア、又はビールスは、この抗体に結合されるとき、流体分子（主として水分子）の相当量を生物学結合層から置換し、その結果電気容量に検出可能な変化を引き起こすだろう。この場合、分子篩膜は必要ないであろう。しかし、表面をメッシュで覆うことは有用である。このセンサの比較例は、絶縁基質上に不動化された“ダミイ”抗体を持つコンデンサからなる。この抗体は、分析質感受抗体と同じクラスだが、テスト環境では発見されない分子に対して特異性のある抗体である。

の非分析質の変化に対する平衡化を行う。しかしながら、多くの比較コンデンサが一つの親和性コンデンサと共に用いられ得る。これらの比較コンデンサは、投与量/応答曲線の終点及び/又は他の特定点を同定する。分析質濃度は、比較コンデンサから与えられる境界値と比較された分析質親和性コンデンサに起こる誘電特性の変化によって測定される。

分子篩は、本発明の親和性センサをテスト流体中に没液することを可能にする。分子篩は次の二つの機能を持つ。(1)センサ中の結合剤分子を保持する。(2)特定の大分子が“開放型”コンデンサのセンサに入るのを選択的に篩分けする。分子篩は、流体及び分析質分子を容易に通すことができるが、より大きな結合剤分子がセンサから逸出するのを許さない孔径を持つ公知の構造からなるものである。抗原・抗体結合系に対する孔径は、センサ内に抗体を保持するために150,000ダルトン以下でなければならないだろう。分子篩は、センサが例えば患者の血液流中に植え付けられる体内センサであるとき、特に有用である。分子篩は、結合系によって解き放された結合剤分子がセンサからの血液流によって除去されるのを防止する。

次の非限定実施例は、微分センサの具体例の数を記述するものである。

実施例1 競合結合具体例

分析質又は分析質類似物質が、連結分子で不動化表面上に不動化され、生化学結合系の第1層を形成する。分析質特異性抗体が不動化された分析質種に結合され、生化学結合系の第2

実施例3 競合結合装置

このセンサは、実施例1に類似したものであるが、生化学的結合系の第2層として抗体の代わりに受容体を用いる。神経毒に対して特有なセンサは、アセチルコリン受容体を用いて形成され得る。スクシニルコリンのような基質は、受容体がそれと親和性をもつが、誘導性基質上で不動化され、生化学的結合系の第1層を形成する。受容体分子は次いで基質に結合され、生化学結合系の第2層を形成する。受容体分子は、分子篩の使用により、センサ内に固定される。神経毒が浸透すると、受容体は表面から脱落し、電気容量が変化する。比較コンデンサは、表面不動化のために選択される分子を、開心物質が受容体を不動化層から脱落させない程度に大きな親和性を持つ分子とする以外は、分析質感受例と同一に作られる。

上記3個の実施例は、多数の可能なセンサ構造に用いられ得るモデルを示すものである。上に示した以外の他の結合剤及び生化学結合系も本発明の範囲内にあると理解されるべきである。

結合系

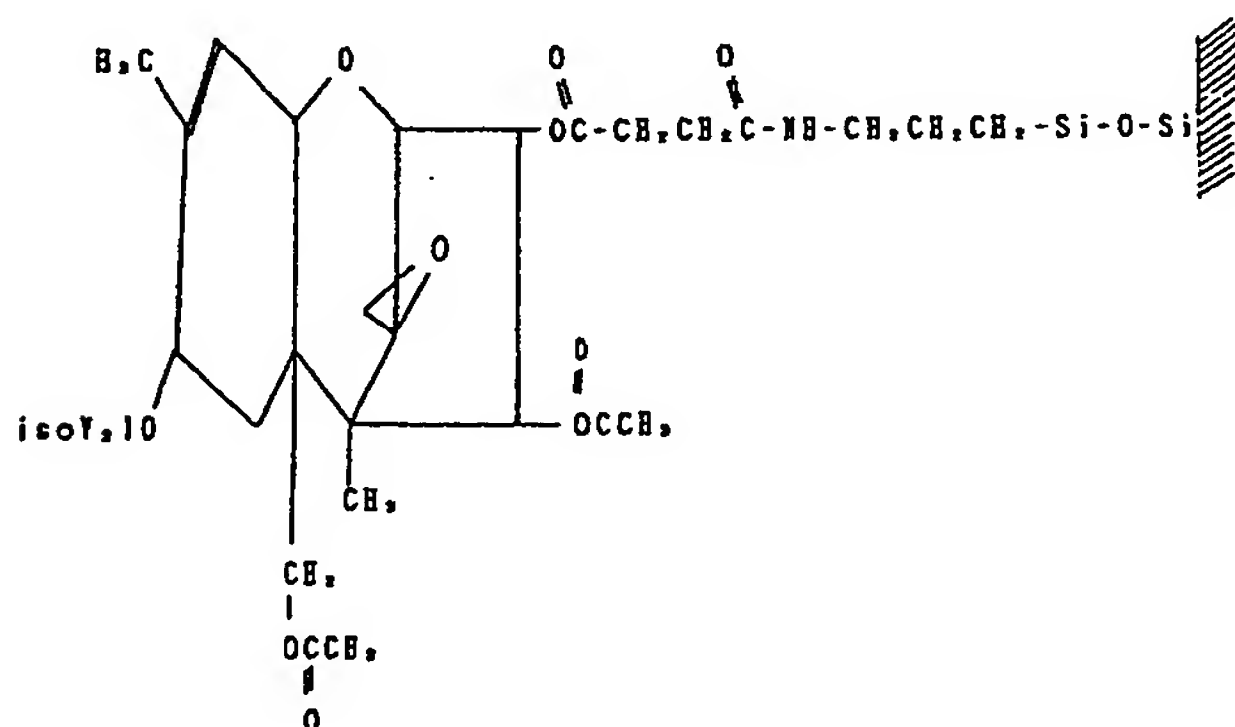
前記の通り、直接結合具体例に対しては、結合剤分子は基質表面上に連結分子によって不動化される。そして、競合結合構造に対しては、分析質又は分析質類似物質の層は、連結分子で、基質表面上に不動化され、生化学結合系の第1層を形成する。分子上の付着サイトは、分子の官能基が互いに干渉を起こさないように選択される。例えば、直接結合例においては、抗体（結

合剤)は、その分析質を認識して結合サイトが機能するに十分自由なように基質上に不動化される。蛋白質の結合にとっては多くの反応が、求核基(きわめてしばしばNH₂、OH又はSH)と求核的である。生化学結合系の特異的実施例は、アフィニティ・クロマトグラフィ技術に見い出され、ウオートズアールの第2表「アフィニティ・クロマトグラフィ」アナリティカル・ケミストリイ[Waters, B., "Affinity Chromatography", Analytical Chemistry], 第57巻、第11号、第1099A~1114A頁に、そして、パリック・アイ、及びビー・クートレカスサスの「アフィニティ・クロマトグラフィ」、ケミカル・アンド・エンジニアリング・ニュース[Parikh, I., and P. Cuatrecasas, "Affinity Chromatography", Chemical and Engineering News], 1985年8月26日、第17~22頁の第19、21及び22頁の図面に各々リストされている(これらの文献は引用によりここに取り込まれる)。付着反応は、臭化シアン、活性エステル、エポキシド、トレスル・クロライド[Tresyl Chloride]、カルボニルジイミダゾール、チオール及びジアゾニウム試薬の使用を含む。

説明のために、出願人により実施された次の実施例は、「開放型」親和性コンデンサへの生化学結合系の共有付着を示すものである。この実施例は、環境中に発見され真菌類種のフアリウム[the fungal species Fvarium]によって生産されるトリコテセン・マイコトキシンT-2 [Trichothecene mycotoxin]を検出するためのセンサである、トリコテセン・マイコトキシンは種々の食用作物において穀物収量の損失を引き起こす農業毒である。

するに当たり、ヒドロコルチゾン ヘミサクシネートをシグマケミカル カンパニーその他の会社から直接購入することができる。

b. 分析質のヘミサクシネート誘導体は、次いで、水溶性カルボジイミドを触媒に用いて、シラン化された表面のアミノ官能基に結合される。T-2分析質はここで「開放型」コンデンサの表面上に不動化される。その表面は次のようになる。



4. 生化学結合系の第2層は、「開放型」コンデンサの表面を濡らしている流体に抗T-2トキシン抗体を添加することにより作られる。抗体は、標準イムノアッセイ(5.28×10³リットル/モル)におけると同様の親和性をもって結合される。得られた生化学結合系は、表面に不動化されたT-2分析質の第

ある。それは人類及び動物の粘液中毒性疾患[mucotoxicoses]に深くかかわってきた。

実施例

1. 「開放型」コンデンサが、厚さ0.3ミクロンのSiO₂層で被覆される。表面の水和を防止するように注意しないと(乾燥真空)、表面はシラノール基で構成されるようになる。



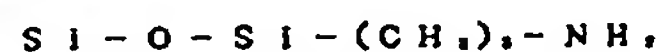
表面はm²当たり約10シラノール[silanol]を持つ。

2. アミノ基が、次のステップを用いて、蛋白質の後の付着のためSiO₂表面に付着される。

a. 10%アミノプロピルトリエトキシシラン[(EIO)₃-Si-(CH₂)₃-NH₂]と乾燥トルエン中に室温で一晩基質を浸漬する。

b. 乾燥トルエンで洗浄する、そして

c. 60℃で2時間乾燥させる。アミノシラン化された表面は下記の通り。



3. 表面は今やトリコテセン(T-2)グループの導入が可能である。

a. T-2分子は、ビリジン及び無水コハク酸の存在下で加熱することによりヘミサクシネート誘導体へ変換される。この誘導体化は本実施例では必要であったが、あるヘミサクシネートは入手可能である。例えばヒドロコルチゾン センサを製造

1層及び該不動化層に特異的に結合された抗T-2トキシン抗体の第2層を持つ。

抗T-2抗体及び不動化されたT-2トキシンは動的平衡にあるから、遊離のT-2トキシン分子の流入は平衡をかき乱し、抗体を不動化表面から引き降ろし、遊離の分析質・抗体複合体を形成する。高い場強度を持つコンデンサ・センサの領域、即ち領域V1から遊離の分析質・抗体複合体が移動することは、流体媒質中の遊離のT-2分子の濃度を直接指標する電気容量に変化を引き起こす。

プロセス回路

第6図は電気容量親和性センサを用いるための典型的なプロセス回路の略図である。この系の心臓部は同期復調器(ロックイン[lock-in]増幅器とも言う)である。出願人は乗算回路上に設けた同期復調器(シグネティックス・コーポレーション社のIC NE5520)を用いた。正弦波電圧発電機70は基準インピーダンス12及び電気容量親和性センサ14を持つ回路に供給される電圧を発生する。同期復調器76は、基準シグナル80に照合して入力シグナル78の位相と振幅によって決定される出力を発生する。出力82は増幅され、電圧計84は親和性センサ14の電気容量の変化を表示するシグナルを提供する。

明らかに、本発明の多くの改変及び変形が上述してきた開示により可能である。それ故、添付の請求の範囲の範囲内で、本発明が上記の具体的記載以外にも実施可能なものを含むことが理解されるべきである。

以上

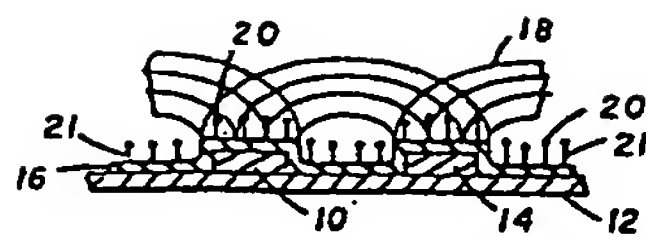


FIG. 1a

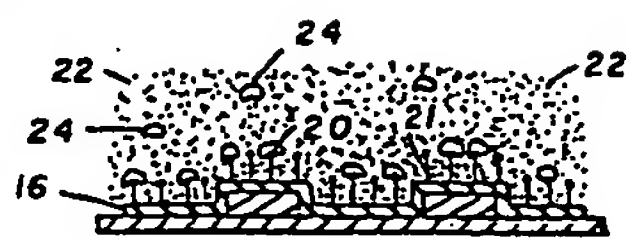


FIG. 1b

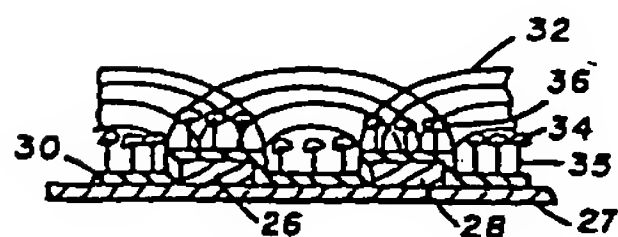


FIG. 2a

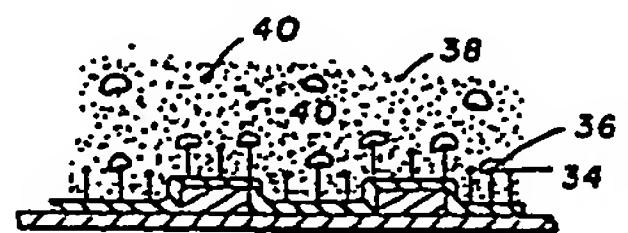


FIG. 2b

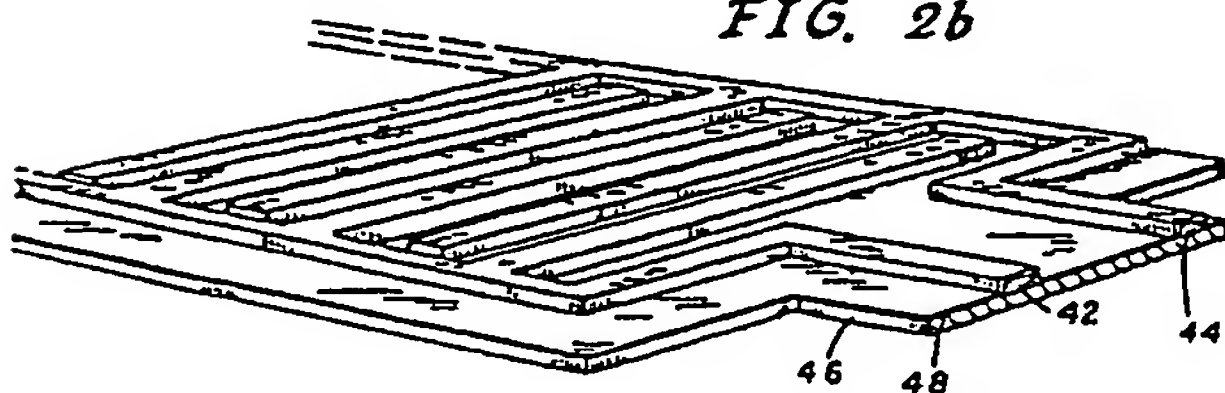


FIG. 3

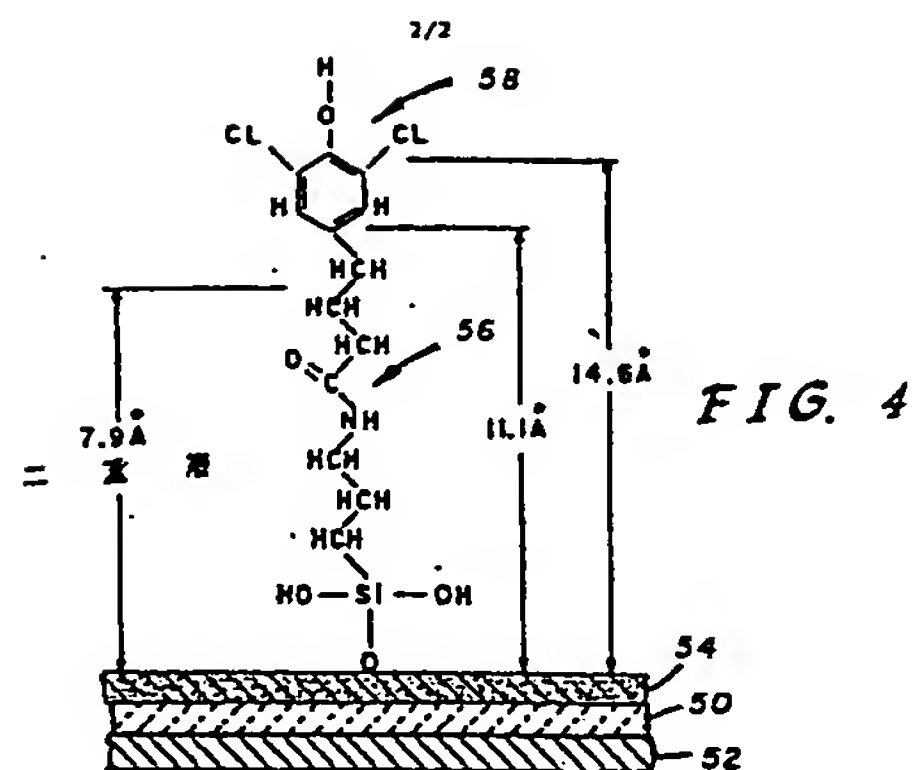


FIG. 4

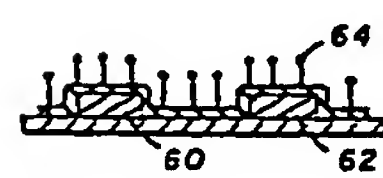


FIG. 5a

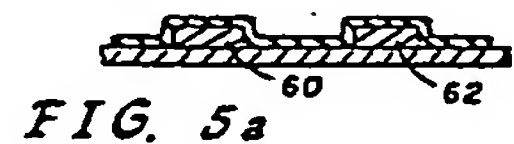


FIG. 5b

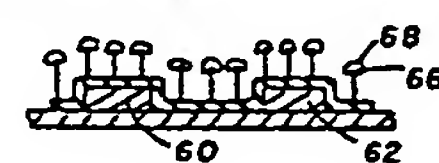


FIG. 5c

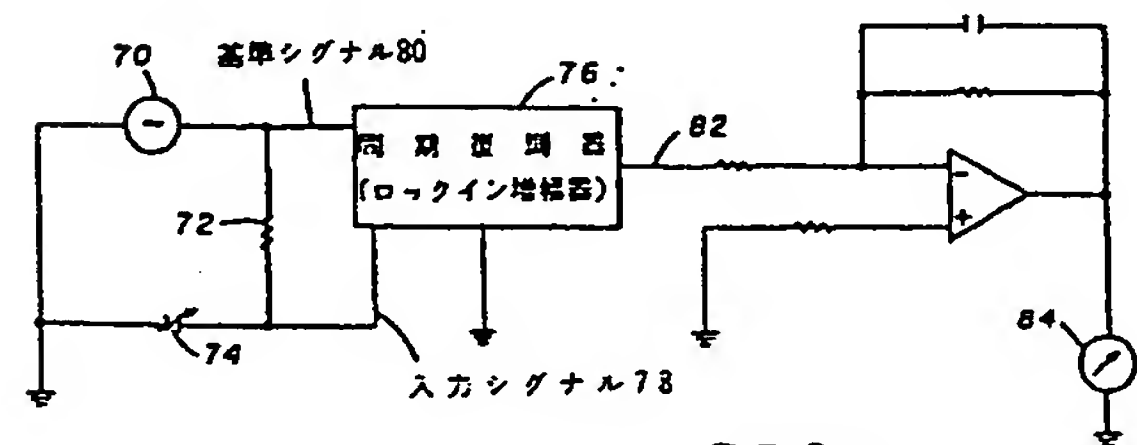


FIG. 6

国際調査報告

International Application No. PCT/US86/01433

1. CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER in simplest classification available, namely, primary and secondary		
According to International Patent Classification (IPC) or to other International Classification and IPC		
IPC(4): G01N 27/22, 33/52		
U.S. CL.: 422/68, 69; 436/528, 806		
2. FIELD SEARCHED		
Minimum Documentation Searched		
Classification System	Classification Symbols	
U.S.	204/403; 324/61R, 61C, 60R, 71-1, 71.4; 422/68, 69, 83, 90, 98; 436/525, 528, DIG 805 DIG 806 435/288, 291, 817	
Documentation Searched other than Minimum Documentation to the extent that such Documentation was included in the Field Searching		
3. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT		
Category *	Citation of Document, with indication, where appropriate, of the relevant passages *	Relevant to Claim No. *
Y	US, A, 4490216 (McCONNELL), Published 25 December 1984. See entire document.	1-16
A	US, A, 4072576 (ARWIN), Published 07 February 1978. Entire document.	1-16
A	US, A, 4280815 (OBERHARDT), Published 28 July 1981. Entire document.	1-16
A	US, A, 4444892 (MALMROS), Published 24 April 1984. Entire document.	1-16
<p>* Basic categories of cited documents: *</p> <p>"A" document defining the general state of the art which is not considered to be of particular relevance</p> <p>"B" earlier document but published on or after the international filing date</p> <p>"C" document which may show doubt on priority claim(s) or which is cited to establish the publication date of another document or other official reason (see specification)</p> <p>"D" document referring to an oral disclosure, use, exhibition or other means</p> <p>"E" document published prior to the international filing date but later than the priority date claimed</p> <p>"F" other document published after the international filing date or priority date and not in conflict with the application but cited to understand the principles or theory underlying the invention</p> <p>"G" document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered novel or cannot be considered to be obvious in view of this document</p> <p>"H" document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered to involve an inventive step when the document is considered with one or more other such documents, such combinations being referred to as a person skilled in the art</p> <p>"I" document member of the same patent family</p>		
IV. CERTIFICATION		
Date of the Actual Completion of the International Search	Date of Making of the International Search Report	
26 July 1988	16 AUG 1988	
International Searching Authority	Signature	
ISA/US	MICHAEL S. MARCUS	

Form PCT/ISA/210 (second sheet) (Rev. 11-82)